

Synthèse enzymatique d'alpha monoglycérides en milieu biphasique

A. EL ZANT (1), M. PINA (1), J. GRAILLE (1), J. GRIMAUD (2) et G. RENARD (2)

Résumé. — Il est possible d'obtenir des alpha monoglycérides purs dans un milieu biphasique (glycérol hydraté/solvant organique) en faisant réagir directement des acides gras saturés ou insaturés en présence d'une poudre lipasique commerciale de *Rhizopus arrhizus* fonctionnant en synthèse. Les effets de la nature des solvants, de la teneur en eau du milieu réactionnel, de la quantité d'enzyme mise en jeu, de la concentration en acides gras et de la température ont été étudiés.

INTRODUCTION

Il est d'actualité de faire appel à la chimie bioorganique ou à la microbiologie lorsque l'organicien a quelques difficultés pour obtenir satisfaction dans une synthèse (rendement, pureté, coût de production). Cet appel se justifie d'autant plus que les molécules mises en jeu sont des biomolécules. Dans ce domaine, Werdelmann et Schmid [1] ont brossé un résumé des principaux travaux sur les biotechnologies des corps gras en insistant sur le défi et l'opportunité de telles recherches.

Sur les 2 000 enzymes environ qui ont été caractérisées, isolées et répertoriées, seulement une trentaine sont utilisées industriellement, pour la plupart dans des réactions d'hydrolyse. Un vaste potentiel reste donc encore inutilisé [2] dans ce domaine et les raisons essentielles de cet usage limité sont principalement économiques, notamment le coût élevé des extractions et celui du fonctionnement d'un grand nombre d'enzymes qui nécessite un cofacteur, biomolécule coûteuse et difficilement recyclable quantitativement.

Les enzymes provoquant les réactions d'hydrolyse d'esters ne nécessitent pas, en général, de cofacteur, ce qui explique leur usage industriel. Si la réaction d'hydrolyse a un intérêt certain, la réaction inverse de synthèse d'esters revêt également un intérêt indiscutable, surtout lorsqu'il s'agit d'esters difficilement accessibles par voie chimique, par exemple lorsqu'un seul isomère optique ou de position est souhaité.

Sur le plan fondamental, du fait de la réversibilité des réactions enzymatiques, la réaction inverse ne devrait pas poser de problème puisqu'il s'agit de déplacer préférentiellement un équilibre chimique dans le sens souhaité, problème simple de la chimie.

Le premier réflexe est de penser qu'il suffit d'opposer un alcool et un acide en présence de l'enzyme en l'absence d'eau pour effectuer la réaction de synthèse.

En fait, ce n'est pas si simple pour 2 raisons essentielles :

- l'eau est le solvant biologique naturel,
- les enzymes ont besoin d'eau pour trouver leur conformation spatiale active.

C'est alors que naquit l'idée de travailler en milieu biphasique eau/solvant organique ou en milieu biphasique solide/liquide, le solide étant l'enzyme hydratée et le liquide un solvant organique non miscible à l'eau.

Mais la nouveauté de ce genre de synthèse et la confidentialité des recherches privées obtenues en la matière font que peu de travaux ont été publiés.

Martinek *et al.* [3] ont fait une mise au point portant sur le déplacement de l'équilibre chimique en synthèse enzymatique en milieu biphasique phase aqueuse/phase organique et ont obtenu avec succès la synthèse d'esters courts, objectif atteint également par Durand et Monsan [4, 5].

En ce qui concerne les esters d'acides gras, Unilever a montré qu'il est possible, grâce à des lipases 1,3 spécifiques, de synthétiser une graisse semblable au beurre de cacao en partant d'une fraction moyenne d'huile de palme et d'acide stéarique [6].

Les lipases utilisées sont souvent d'origine microbienne. Okumura *et al.* ont très rapidement vu l'intérêt de l'utilisation des lipases dans le sens de la synthèse [7, 8, 9]. Ils ont notamment obtenu dans les conditions les plus favorables 65 % d'un mélange mono/diglycérides après 18 h à 30 °C à partir de glycérol et d'acide gras en présence de lipase.

Il nous est alors paru possible d'améliorer ce type de réaction afin d'obtenir des alpha monoglycérides purs. De ce fait, partant du glycérol et d'acides gras purs dans un solvant organique, il est envisageable de les synthétiser avec la lipase commerciale de *Rhizopus arrhizus*, 1,3 spécifique, qui fonctionne alors non pas en hydrolase mais en ester synthétase en présence d'une phase aqueuse limitée [10].

Nous décrivons dans ce travail la synthèse d'alpha monoglycérides purs, soit avec des acides gras totaux d'origines diverses, soit avec des acides gras purs.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

La lipase de *Rhizopus arrhizus* utilisée est une lipase 1,3 spécifique qui nous a été gracieusement fournie par la société Gist-Brocades (France). Le glycérol bidistillé et l'acide oléique ont été achetés auprès de la société Merck. Les autres composés utilisés sont de source commerciale.

Les abréviations utilisées sont : TG = triglycéride, DG = diglycéride, MG = monoglycéride, AGL = acide gras libre, THF = tétrahydrofurane.

(1) Division Chimie des Corps Gras, IRHO-CIRAD, B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex (France).

(2) E.N.S.C.M., 8, rue de l'Ecole Normale, 34075 Montpellier Cedex (France).

Conditions opératoires des essais.

Les réactions sont conduites sous agitation (400 rpm) dans une enceinte thermostatée. Dans un flacon de 25 ml hermétiquement fermé, on introduit 5 g d'un mélange glycérol/eau contenant 50 mg de lipase (*R. arrhizus*) et 10 ml d'une solution à 2 % d'AGL (200 mg) dans le solvant organique choisi non miscible à la phase glycérolique.

Après pesée du glycérol, la quantité convenable d'eau est ajoutée à la pipette de précision, pour obtenir la proportion pondérale voulue. Ensuite l'enzyme est ajoutée sous forme de poudre puis dispersée dans la phase glycérolique jusqu'à homogénéité. On laisse au repos 10 min. La solution d'AGL est alors ajoutée. L'agitation provoque le contact des deux phases non miscibles. La réaction est stoppée par l'arrêt de l'agitation. Les phases se séparent et l'enzyme reste dans la phase glycérolique.

La phase organique contenant les glycérides synthétisés et les acides gras restants peut être récupérée quantitativement, lavée à l'eau distillée puis séchée avec du sulfate de sodium anhydre. Le solvant est éliminé à l'évaporateur rotatif et le mélange lipidique pesé puis repris par 10 ml du même solvant organique et conservé à 4 °C sous atmosphère d'azote.

Quantification des produits de la réaction [11, 12].

L'évaluation des glycérides synthétisés s'effectue par chromatographie sur couche mince (CCM) (déposeur automatique Linomat III de Camag, évaluation photodensimétrique scanner de Camag, intégrateur de surface Enica de Delsi).

Les plaques commerciales de silice G60 de 0,25 mm d'épaisseur (Merck) sont lavées à front perdu à l'éther éthylique distillé pour éliminer toute trace de matière organique.

En CCM quantitative, la nécessité d'obtenir des Rf compris entre 0,3 et 0,7 oblige à effectuer la séparation des mélanges de glycérides selon les 2 systèmes d'élution suivants :

— Hexane/ether éthylique/acide acétique : 75/25/1 (v/v/v) pour doser TG, DG, AGL ;

— Hexane/ether éthylique/acide acétique : 10/90/1 (v/v/v) pour doser MG.

Le dépôt en bande effectué automatiquement à l'aide d'un déposeur à commande électronique permet d'obtenir une répétitivité remarquable des bandes qui demeurent suffisamment étroites et rectilignes, conditions favorables pour une estimation quantitative. Après évaporation du solvant, les chromatoplaques sont révélées par dispersion, durant 20 secondes, d'un mélange acétate de cuivre saturé d'eau/acide phosphorique (v/v) fraîchement préparé. La pression appliquée sur le disperseur dont on dispose est de 0,25 bar. La révélation des plaques est obtenue par chauffage à 180 °C pendant 10 min très précisément. Le respect scrupuleux du protocole opératoire de carbonisation contribue aussi largement à la répétitivité des densités optiques. Dans ces conditions les substances apparaissent sous forme de bandes noires d'une façon très reproductible. Les bandes sont ensuite évaluées par photodensitométrie en réflexion à 500 nm, longueur d'onde optimale. Les photodensitogrammes sont traités automatiquement.

Au préalable, une droite d'étalonnage a été établie pour une gamme croissante avec des témoins purs de 0 à 25 µg de chaque catégorie lipidique. Dans les conditions précitées, tous les constituants ont une même et seule droite de

réponse. La linéarité de l'équation est vérifiée jusqu'à 15 µg de carbone.

Identification par chromatographie en couche mince des monoglycérides synthétisés.

Le monoglycéride obtenu par voie enzymatique est déposé sur une plaque de silice préalablement imprégnée d'une solution d'acide borique à 5 % puis réactivée. Le système de migration est constitué du mélange chloroforme/acétone/acide acétique/méthanol (72,5/25/0,5/2 : v/v/v/v) dans lequel les Rf respectifs des α et β MG sont de 0,45 et 0,63 ce qui permet de vérifier que la réaction réalisée par voie enzymatique ne synthétise des α MG.

Synthèse enzymatique d' α MG en réacteur discontinu dans le dichlorométhane.

Dans un réacteur de 500 ml, muni d'une agitation mécanique et d'un réfrigérant, on mélange 150 g de la solution glycérol/eau (75/25 (p/p)), 1,5 g de lipase (*R. arrhizus*) et 300 ml d'une solution à 2 % d'AGL dans le dichlorométhane.

La réaction s'effectue à 30 °C pendant 8 heures. La légère émulsion obtenue en fin de réaction est détruite par l'ajout de 600 ml de dichlorométhane.

La phase organique ainsi obtenue est lavée à froid par une solution éthanolique à 20 % de soude 1N pour éliminer les AGL en excès. Après séchage sur sulfate de sodium et évaporation du solvant sous vide, on recueille les α MG purs (rendement = 20 %).

Les AGL peuvent être régénérés en milieu acide et recyclés dans le système, ainsi que la phase glycérolique.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dans le système biphasique choisi, la lipase fonctionne à l'interface phase aqueuse/phase organique. Il est alors possible de choisir un solvant organique non miscible au glycérol et dans lequel acides gras et monoglycérides obtenus soient miscibles. Mais pour faire fonctionner une lipase dans le sens inverse de la réaction normale d'hydrolyse dans un système biphasique par déplacement de l'équilibre de la réaction dans le sens de la synthèse, il faut limiter la quantité d'eau au strict nécessaire pour permettre le fonctionnement de l'enzyme et l'obtention d'une conversion maximale en α MG.

La solubilité de l'eau dans les solvants organiques n'est pas nulle et varie de façon considérable d'un solvant à un autre et suivant la température de la réaction. Par conséquent, la proportion optimale d'eau de la phase glycérolique a été déterminée pour l'ensemble des solvants organiques utilisés. Les réactions ont toutes été effectuées à 39 °C.

Les résultats obtenus pour chaque proportion optimale d'eau en fonction du meilleur rendement observé pour chaque solvant ont été regroupés dans le tableau I.

Les résultats du tableau I indiquent que la proportion optimale d'eau varie sensiblement selon la nature du solvant utilisé et plus particulièrement avec son aptitude à dissoudre, donc à extraire de la phase glycérolée, l'eau pré-

TABLEAU I. — Influence de la nature des solvants sur le taux de synthèse en α MG pour les réactions effectuées à 39 °C et pour un rapport pondéral glycéril/eau (G/E) optimal

Solvant	G/E	Taux de	
		synthèse en α MG (%)	pureté (%)
Chloroforme	80/20	23	82
Ether ethyl	90/10	20	80
CH ₂ Cl ₂	75/25	16	98
Toluène	90/10	10	40
Chlorobenzène	80/20	9	95
Acétate ethyl	85/15	8	100
Acétone	90/10	4	100
CCl ₄	98/2	3	100
n Heptane	95/5	3	7
THF	90/10	2	100
n Hexane	90/10	2	10

Le taux de pureté est défini comme étant la proportion centésimale d' α MG par rapport à la totalité des glycérides obtenus. Les conditions des synthèses sont celles décrites dans « Matériel et méthodes »

sente dans le milieu réactionnel. Ce paramètre est notamment très sensible pour les solvants ayant donné les meilleurs taux de synthèse en α MG (la proportion optimale d'eau dans la phase glycérolée initiale est respectivement de 20, 10 et 25 % pour le chloroforme, l'éther éthylique et le dichlorométhane). Puisque ces trois solvants nous ont donné un bon taux de synthèse, c'est vers eux qu'il nous faut rechercher l'optimisation de la synthèse de l' α MG. Cependant, l'éther éthylique n'étant pas un solvant très courant dans l'industrie, nous n'avons retenu que le chloroforme et le dichlorométhane pour rechercher un taux de synthèse et une pureté convenable en α MG synthétisés (Fig. 1).

Compte tenu que la réaction enzymatique s'effectue à l'interface du système biphasique, il est probable que la quantité d'enzyme la plus efficace mise en jeu dans les conditions opératoires choisies doit passer par un maximum tributaire de la surface de l'interface disponible. Ce paramètre a été étudié et la figure 1 confirme que le taux de synthèse en α MG croît jusqu'à 50 mg d'enzyme et devient indépendant au-delà de cette quantité. En effet, au-delà de cette limite la quantité d'enzyme excédentaire ne peut plus parvenir à l'interface et n'est plus d'aucune utilité pour la synthèse. D'autre part on remarque que le taux de pureté augmente en même temps que la saturation de l'interface. Ceci peut se comprendre sur la base de la célérité avec laquelle la réaction s'effectue, l' α MG étant le premier produit à se former.

Il semble logique de penser que la pureté du MG soit en relation avec la quantité d'AGL disponible à l'interface. Cette disponibilité en AGL à l'interface peut varier de deux façons : soit en augmentant la concentration en AGL pour un même volume de solvant, soit en faisant varier le volume de solvant pour une même quantité d'AGL par unité de volume de ce solvant.

Les résultats obtenus avec le chloroforme et le dichlorométhane pour des réactions effectuées à 30 °C sont regroupés dans le tableau II en ce qui concerne la variation de concentration initiale en AGL pour un volume de phase constant de 10 ml et dans le tableau III en ce qui concerne la variation de volume de phase organique pour une quantité d'AGL constante de 200 mg.

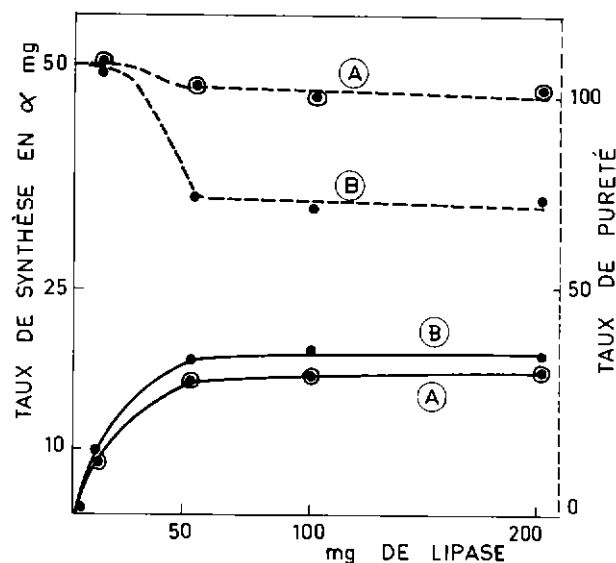


FIG. 1. — Etude de la réaction en fonction de la quantité d'enzymes mise en jeu.

(A) Dichlorométhane.
(B) Chloroforme.

TABLEAU II. — Etude de la réaction avec le chloroforme et les dichlorométhane en fonction de la concentration en AGL pour un volume constant de phase organique

AGL (%)	Chloroforme		Dichlorométhane	
	Taux de		Taux de	
	synthèse en MG (%)	pureté (%)	synthèse en MG (%)	pureté (%)
0,2	21	67,5	22	80
0,5	19,5	73	20,5	91
1	19	72	20	90
2	17,5	71	18	87
4	15,5	93	15	93
10	13,5	95	13	95

Le taux de pureté est défini comme étant la proportion centésimale d' α MG par rapport à la totalité des glycérides obtenus. Les conditions des synthèses sont celles décrites dans « Matériel et méthodes ».

Dans le tableau II on constate que pour un volume constant, plus la quantité d'acide gras disponible est faible, meilleur est le rendement de synthèse en α MG. Ceci peut se concevoir sur la base d'une aptitude à l'extraction plus importante du α MG formé par le solvant organique contenant de ce fait moins d'AGL. Toutefois, ce meilleur rendement se fait au détriment de la pureté en MG puisque la compétition pour revenir se fixer sur l'enzyme libre entre le MG et l'AGL à l'interface du système est plus importante. Si l' α MG formé retourne vers l'enzyme il se forme du DG. Ainsi, plus la quantité d'AGL est grande, meilleure est la sélectivité en α MG formé.

Les résultats du tableau III confirment ceux du tableau II. En effet, pour une même quantité totale d'AGL disponible à l'interface, une augmentation de la quantité de solvant, et donc de l'aptitude à extraire l' α MG, favorise la pureté de ce dernier, le taux de transformation étant pratiquement identique dans tous les cas.

TABLEAU III. — Etude de la réaction avec le chloroforme et le dichlorométhane en fonction du volume de phase organique pour une quantité d'AGL constante

Volume de solvant	AGL (%)	Chloroforme		Dichlorométhane	
		Taux de		Taux de	
		synthèse (%)	pureté (%)	synthèse (%)	pureté (%)
2	10	16,5	31,5	18,5	67
5	4	18	43	19,7	73
10	2	17,5	71	18	87
15	1,33	18,5	79	15	90

Le taux de pureté est défini comme étant la proportion centésimale d' α MG par rapport à la totalité des glycérides obtenus. Les quantités de phases glycérol/eau sont de 5 g suivant les proportions pondérales retenues dans le tableau I, la quantité de lipase étant de 50 mg par essai.

TABLEAU IV. — Etude de la réaction en fonction de la température pour un rapport pondéral glycérol/eau optimal

Température (°C)	Chloroforme				Dichlorométhane			
	21	30	38	48	21	30	38	48
Glycérol/eau	70/30	80/20	80/20	75/25	90/10	75/25	75/25	75/25
Taux de synthèse en α MG (%)	13	17	23	13	15	21	16	
Taux de pureté (%)	83	75	82	98	79	93	98	

Le taux de pureté est défini comme étant la proportion centésimale d' α MG par rapport à la totalité des glycérides obtenus. Les quantités de phases glycérol/eau sont de 5 g suivant les proportions pondérales retenues dans le tableau I, la quantité de lipase étant de 50 mg par essai.

Ce travail a fait l'objet d'un dépôt de brevet au nom des Etablissements GATTEFOSSE. N° de dépôt : 85-14827 du 7 octobre 1985 ; N° de publication : Fr 2 588 272 du 10 avril 1987.

Le dernier facteur important à maîtriser est la température. Elle est susceptible d'agir à trois niveaux :

- diminution de l'énergie d'activation de la molécule,
- solubilisation accrue des produits réactionnels,
- augmentation de l'interface phase aqueuse/phase glycérolée.

Pour étudier ce paramètre nous avons dû établir pour les deux solvants retenus le rapport optimal glycérol/eau pour chaque température envisagée. Les résultats obtenus pour chaque optimum sont regroupés dans le tableau IV.

L'augmentation de la température favorise la réaction jusqu'à ce que son effet se fasse ressentir sur l'activité du catalyseur. Pour le chloroforme, les meilleurs taux de transformation sont obtenus pour 38 °C alors qu'avec le dichlorométhane, la synthèse optimale se situe à 30 °C. Dans ce dernier cas, il faut remarquer que pour des températures supérieures, bien que les rendements de synthèse soient diminués, la pureté est par contre améliorée de façon très sensible.

CONCLUSION

En conclusion nous avons pu montrer qu'il est possible d'obtenir par synthèse enzymatique des α MG purs. Le choix du solvant est un facteur essentiel de l'orientation de la réaction. Ainsi, avec du dichlorométhane à 30 °C pendant 8 h il est possible d'obtenir par action de lipase de *Rhizopus arrhizus* sur du glycérol aqueux et de l'acide oléique, de l'alpha monoglycéride pur.

Cependant, il semble que l'aptitude du solvant organique à extraire à partir du complexe enzyme/substrat le produit de la réaction soit une des causes principales de l'obtention des α MG.

Le choix d'un solvant dans lequel le MG formé ne serait pas soluble devrait en conséquence orienter la réaction vers la formation de DG, objectif sur lequel nous travaillons actuellement.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] WERDELMANN B. W., SCHMID R. D. (1982). — *Fette Seifen Anstrichmittel*, 84, N° 11, p. 436-443.
- [2] MONSAN P. (1982). — *Bio-Sciences*, 1, 40.
- [3] MARTINEK K., SEMENOV A. N., BEREZIN I. V. (1981). — *Biochimica Biophysica Acta*, 658, 76.
- [4] TARQUIS D., MONSAN P., DURAND G. (1979). — Table Ronde « Les bioconversions en synthèse organique » - U.S.T.L., Montpellier, Communication 122-23.
- [5] MONSAN P. (1982). — Journée bioconversions, E.S.C.M., Marseille, Communication 36-52.
- [6] Unilever N.V., Brevet anglais n° 7703615.
- [7] OKUMURA S., IWAI M., TSUJISAKA Y. (1981). — *Agricultural Biology Chemistry*, 45, 185.
- [8] OKUMURA S., IWAI M., TSUJISAKA Y. (1979). — *Biochimica Biophysica Acta*, 575, 156.
- [9] TSUJISAKA Y., IWAI M., OKUMURA S. (1977). — *Biochimica Biophysica Acta*, 489, 415.
- [10] PINA M., GRAILLE J. (1983). — Bulletin Technique - Gattefosse Report, p. 34-36.
- [11] NAUDET M., PASERO J., BIASINI S. (1965). — *Revue Française Corps Gras*, 12, 528.
- [12] PINA M. (1983). — Acte de Groupe de Travail Chimie n° 2. « Techniques chromatographiques au service de l'agronomie », GERDAT, Montpellier.
- [13] THOMAS A. E. III., SHAROUN J. E., RALSTON H. (1965). — *J.A.O.C.S.*, 42, 789.

SUMMARY

Enzymatic synthesis of alpha monoglycerides in a diphasic medium.

A. EL ZANT, M. PINA, J. GRAILLE, J. GRIMAUD and G. RENARD, *Oléagineux*, 1988, 43, N° 8-9, p. 355-358.

It is possible to obtain pure alpha monoglycerides in a diphasic medium (hydrated glycerol/organic solvent) by causing saturated or unsaturated fatty acids to react directly in the presence of a commercially available lipase powder of *Rhizopus arrhizus* functioning in synthesis. The effects of the type of solvents, reaction medium water content, quantity of enzyme used, fatty acid concentration and temperature are studied.

RESUMEN

Síntesis enzimática de alfa monoglicéridos en medio bifásico.

A. EL ZANT, M. PINA, J. GRAILLE, J. GRIMAUD y G. RENARD, *Oléagineux*, 1988, 43, N° 8-9, p. 355-358.

Alfa monoglicéridos puros pueden obtenerse en medio bifásico (glicerol hidratado/disolvente orgánico) haciendo reaccionar directamente ácidos grasos saturados o insaturados en presencia de un polvo lipásico comercial de *Rhizopus arrhizus* que funcionaba en síntesis. Los efectos de la índole de los disolventes, del contenido de agua del medio de reacción, de la cantidad de enzimas que intervienen, de la concentración de ácidos grasos y de la temperatura han sido estudiados.